

669

**Recommandation
du Comité de Ministres de
l'Union économique Benelux
concernant l'application de méthodes
d'analyse de référence Benelux se
rapportant à la Recommandation
M (63) 19, relative à l'harmonisation
des législations en matière de cacao
et de chocolat,**

M (67) 7

Le Comité de Ministres de l'Union économique Benelux,

Vu les articles 3, 6 et 7 du traité d'Union,

Vu l'article 9 de la Convention transitoire,

Vu la Recommandation du Comité de Ministres du 23 septembre 1963, relative à l'harmonisation des législations en matière de cacao et de chocolat, M (63) 19,

Considérant qu'il y a lieu d'éviter des contestations nées de l'application de techniques d'analyse différentes ou de l'emploi de normes différentes,

Considérant qu'en particulier l'harmonisation du contrôle des denrées alimentaires exige la mise en œuvre de techniques identiques ou équivalentes et l'emploi de modes d'expression semblables et le recours à des normes identiques ou équivalentes,

Recommande :

Article unique

Les Gouvernements des trois pays du Benelux sont invités à introduire, avant le 1^{er} juillet 1967 dans leurs législations, comme seules méthodes de référence valables, les méthodes d'analyse ci-annexées relatives au cacao et au chocolat.

Fait à Bruxelles, le 12 avril 1967.

Le Président du Comité de Ministres,

P. GREGOIRE.

670

Méthodes d'analyse de référence Benelux
concernant le cacao et le chocolat,

M (67) 7, Annexe

1. Préparation des échantillons

1.1. *Cacao en grains*

Broyer dans un mortier chauffé à environ 50 °C jusqu'à obtention d'une masse plus ou moins fluide mais parfaitement homogène. Transvaser dans un récipient à large ouverture et refroidir rapidement. Traiter la masse selon 1.5.

1.2. *Cacao en pâte et tous les tourteaux de cacao*

Traiter selon 1.5.

1.3. *Cacao en poudre (sucré ou non)*

Mélanger soigneusement.

1.4. *Beurre de cacao*

Fondre à environ 40 °C et homogénéiser.

1.5. *Chocolat, chocolat de couverture, chocolat au lait, chocolat au lait de couverture*

Râper finement en évitant un échauffement ; mélanger les râpures.

1.6. *Chocolat vermicelle, chocolat en flocons, chocolat vermicelle au lait, chocolat en flocons au lait*

Mélanger soigneusement.

1.7. *Chocolat fourré*

Prélever l'enveloppe extérieure de chocolat en ayant soin d'éliminer les parcelles de pâte fourrée qui pourraient y adhérer.

Râper l'enveloppe en procédant selon 1.5.

1.8. *Chocolat aux noisettes, chocolat au lait aux noisettes* tels que définis aux articles 4c) et 5c) de la Recommandation M (63) 19

1.8.1. *Noisettes entières et gros fragments*

Briser un échantillon de poids connu ou, le cas échéant, le chauffer modérément de façon à pouvoir en séparer à la pince les fragments les plus importants de noisettes, noix ou amandes. Les peser. Refroidir si nécessaire et traiter selon 1.5 ou 1.8.2

1.8.2. *Noisettes finement broyées*

Réactif : éther de pétrole, P.E. 40-60 °C.

- 1.8.2.1. Prendre une partie proportionnelle d'un certain nombre de bâtons ou de tablettes afin d'obtenir 50 g, les introduire dans un b cher, ajouter de l'éther de pétrole, triturer le chocolat. (Le contact entre les noisettes et l'éther de pétrole doit être de courte durée pour éviter l'extraction de graisse des noisettes).
- 1.8.2.2. Mettre un creuset de porcelaine à fond filtrant de grand modèle (creuset selon Gooch, diamètre supérieur 5,5 cm, diamètre des trous 0,6 mm environ, sans plaque et sans couche filtrante) dans un petit cristallisoir et peser le tout.
- 1.8.2.3. Verser le mélange d'éther de pétrole et de chocolat dans le creuset préalablement placé sur un entonnoir à filtration (sans utiliser le vide). Les fragments des noisettes restent dans le creuset : la solution de graisse, la poudre de cacao, la poudre de lait, la poudre de sucre, etc. passent.
Laver le creuset et le contenu à l'éther de pétrole jusqu'à ce que celui-ci passe limpide.
- 1.8.2.4. Faire passer les noisettes du creuset dans le cristallisoir et les y répartir sur le fond. Maintenir le cristallisoir avec le creuset pendant 24 h à 30  C environ, puis durant 24 h à l'air à la température ambiante et peser (le taux d'humidité des noisettes est alors de nouveau en équilibre avec le taux d'humidité de l'air).
- 1.8.2.5. Tarer un filtre de papier, l'humecter d'éther de pétrole et filtrer la suspension obtenue en 1.8.2.3. ainsi que les solutions p trol niques de lavage. Rincer le filtre jusqu'à élimination complète de la graisse.
- 1.8.2.6. Sécher et peser le filtre, conserver le contenu dans un flacon bien fermé pour l'analyse ultérieure.
- 1.8.2.7. Evaporer complètement les solutions p trol niques dans un ballon taré, sécher et peser. Conserver le résidu pour l'analyse ultérieure.

2. Humidité

Réactif :

Sable : lavé à l'acide chlorhydrique et séché.

Tarer un pèse-filtre à forme plate avec couvercle rodé contenant environ 20 grammes de sable et une petite baguette de verre. Y introduire 5 grammes de la denrée préparée selon 1. et peser le tout. Mélanger ensuite à l'aide de la baguette de verre et sécher le mélange à l'étuve à 100-103  C pendant quatre heures au moins et jusqu'à ce que deux pesées effectuées après un intervalle de 45 minutes n'accusent pas de perte de poids supérieure à 5 mg.

La perte de poids, rapportée à 100 grammes de la denrée, représente le taux d'humidité.

3. Graisse

Réactifs :

éther de pétrole P.E. 40°-60 °C
acide chlorhydrique, 25 % en poids
solution nitrate d'argent 0,1 n

Suivant la teneur présumée en graisse, mélanger 3 à 10 g de la denrée préparée selon 1. avec 45 ml d'eau bouillante jusqu'à ce qu'une suspension homogène soit obtenue. Ajouter ensuite 55 ml d'acide chlorhydrique et faire bouillir doucement cette suspension pendant 15 min. Filtrer la suspension encore chaude sur un filtre préalablement mouillé et laver le filtre à l'eau bouillante jusqu'à ce que l'eau de lavage ne donne plus la réaction des chlorures avec la solution de nitrate d'argent.

Transférer le filtre dans une cartouche à extraction, dégraissée. Sécher pendant 6 h au maximum à 100°-103 °C. Introduire la cartouche séchée dans l'appareil de Soxhlet ou un appareil d'extraction similaire dont le ballon a été préalablement taré. Procéder pendant 4 h à l'extraction de la graisse avec de l'éther de pétrole.

Distiller l'éther de pétrole et sécher le ballon contenant la graisse pendant 1 h à 100°-103 °C. Peser le ballon avec son contenu et remettre à l'étuve pendant 30 min. Le poids est à considérer comme constant dès que la variation entre deux pesées successives ne dépasse pas 5 mg.

Le poids du résidu obtenu, rapporté à 100 g de la denrée, représente la teneur en graisse.

4. Cendres

Introduire 5 g de la denrée préparée selon 1. dans une capsule de platine tarée. Calciner dans un four électrique en élevant peu à peu la température jusqu'à 550 °-600 °C.

Continuer l'incinération jusqu'à obtention de cendres tout à fait blanches.

Après refroidissement dans un exsiccateur, peser et calculer le résultat en pour-cent de la matière sèche et dégraissée.

5. Alcalinité des cendres

Réactifs :

acide chlorhydrique 0,5 n
solution de soude caustique 0,1 n

Solution tampon pH = 4,5 : mélanger 719 ml de solution de citrate de sodium (dissoudre 21 g d'acide citrique ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) dans 200 ml de solution de soude caustique n et compléter à un litre à 20 °C avec de l'eau distillée fraîchement bouillie) et 281 ml d'acide chlorhydrique 0,1 n. Ajouter 10 mg d'iodure de mercure (II) pour assurer la conservation de la solution tampon.

Vert de bromocrésol : 0,75 g de vert de bromocrésol dans 100 ml d'éthanol à 95 % vol.

673

- 5.1. Reprendre les cendres obtenues sous 4, dans un peu d'eau bouillante et transférer la suspension de cendres dans un matras conique. Rincer au moins deux fois la capsule avec de l'eau bouillante et verser les eaux de lavage dans le matras conique.

A l'aide d'une pipette, ajouter dans le matras conique, 10 ml d'acide chlorhydrique 0,5 n. Chauffer le matras pendant 15 minutes sur un bain-marie bouillant. Filtrer la suspension et recueillir dans un matras conique. Laver le filtre et son contenu jusqu'à ce que les eaux de lavage ne donnent plus de réaction acide.

Titrer en retour le filtrat obtenu, par la solution de NaOH 0,1 n, en présence de deux gouttes de solution de vert de bromocrésol, jusqu'à obtention d'une coloration verte identique à celle de la solution tampon pH 4,5, à laquelle ont été ajoutées également deux gouttes d'indicateur. Soit *a* ml.

- 5.2. Titrer dans les mêmes conditions par la même solution de NaOH 0,1 n, 10 ml d'acide chlorhydrique 0,5 n dilué au même volume que l'essai principal. Soit *b* ml.

- 5.3. L'alcalinité exprimée en ml de solution de soude caustique *n* pour 100 g de matière sèche et dégraissée est obtenue par la formule :

$$\frac{b-a}{10} \times \frac{100}{p} \times \frac{100}{100-g-h}$$

p = poids en g de la denrée d'origine

g = pourcentage de matière grasse

h = pourcentage d'humidité

6. Identification des sucres par chromatographie sur papier

Réactifs :

- Solution d'hexacyanoferrate de potassium (II) : dissoudre 106 g de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ dans de l'eau distillée et diluer jusqu'à un litre ;
- Solution d'acétate de zinc : dissoudre 238 g de $(CH_3COO)_2Zn \cdot 3H_2O$ dans de l'eau distillée, ajouter 30 g d'acide acétique et diluer à l'eau distillée jusqu'à un litre ;
- Phases mobiles pour chromatographie :
 - a) mélange de 6 vol. d'acétate d'éthyle, 3 vol. d'acide acétique et de 2 vol. d'eau
 - b) mélange de 5 vol. de *n*. butanol ; de 3 vol. de pyridine, de 1 vol. de benzène et de 3 vol. d'eau ;

674

— Révélateurs :

- a) dissoudre 1,66 g d'acide phtalique et 0,93 g d'aniline dans 100 ml de n butanol saturé d'eau. La solution se conserve bien
- b) dissoudre 4 g de p-anisidine dans 96 ml d'acétone (solution A)
dissoudre 4 g de diphenylamine dans 96 ml d'acétone (solution B)
ajouter goutte à goutte, tout en remuant, 10 ml d'acide phosphorique 85 % à 50 ml de la solution A. Si la solution obtenue n'est pas limpide, y ajouter quelques gouttes d'acide phosphorique jusqu'à ce que la solution soit parfaitement limpide. Ajouter ensuite, tout en agitant vivement, 50 ml de la solution B. Le réactif doit être préparé immédiatement avant l'emploi. Les solutions A et B, isolées, se conservent longtemps ;

— Solutions de sucre : préparer des solutions à 1 % de saccharose, de glucose, de fructose, de maltose et de lactose dans de l'éthanol 50 % vol. ;

— Papier pour chromatographie : Whatman n° 1 ou équivalent.

6.1. Isolement

- 6.1.1. Placer dans un tube à centrifugation 5 g de la denrée préparée selon 1. Ajouter 15 ml d'eau distillée à 60 °C environ et remuer énergiquement.
- 6.1.2. Laisser refroidir le contenu du tube, ajouter 1 ml de la solution d'hexacyanoferrate de potassium (II) et 1 ml de la solution d'acétate de zinc, en remuant vivement après chaque adjonction.
- 6.1.3. Centrifuger pendant 10 minutes à 3.000-3.500 tours par minute, filtrer ensuite le liquide à travers un filtre de papier.

6.2. Identification

- 6.2.1. Déposer sur la ligne de départ d'une feuille de papier pour chromatographie, 5 μ l de la solution obtenue et 5 μ l de chacune des solutions-témoins de saccharose, de glucose, de fructose, de maltose et de lactose.
- 6.2.2. Chromatographier par voie descendante à l'aide de l'une des phases mobiles pendant 16 heures au moins.
- 6.2.3. Sécher le chromatogramme à l'air. Traiter selon 6.2.4. ou 6.2.5.
- 6.2.4. Vaporiser la solution aniline-phtalate sur le chromatogramme sec et chauffer celui-ci à 130°C pendant 5 à 10 minutes. Les produits de réaction des sucres apparaissent sous forme de taches brunes.

- 6.2.5. Passer une fois rapidement le chromatogramme sec dans la solution de p-anisidine-diphénylamine et chauffer celui-ci pendant 5 minutes à 100-105°C. Les produits de réaction apparaissent sous la forme de taches colorées.

7. Dosage du saccharose

Cette méthode ne s'applique qu'en l'absence d'autres substances optiquement actives hydrolysables.

Réactifs :

Acétate basique de plomb : dissoudre 230 g d'acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) dans environ 700 ml d'eau en ébullition. Tout en remuant constamment, ajouter graduellement, pendant l'ébullition, 120 g d'oxyde de plomb (PbO). Lorsque la plus grande quantité possible d'oxyde de plomb est dissoute, filtrer à chaud la solution dans un ballon jaugé d'un litre. Laver le résidu à l'eau bouillante. Refroidir le filtrat jusqu'à 20°C, compléter avec de l'eau jusqu'à 1 litre, bien mélanger.

Acide acétique glacial : 98-100 %

Acide chlorhydrique 6,3 n : diluer 630 ml d'acide chlorhydrique ($d = 1,16 - 1,18$) avec de l'eau dans un ballon jaugé jusqu'à 1 litre. Déterminer le titre de cette solution : pipeter 5 ml dans un ballon jaugé de 100 ml et compléter avec de l'eau jusqu'à la marque. Titrer 10 ml de cette dernière solution avec NaOH 0,1 n en employant la phénolphthaléine comme indicateur. On doit employer exactement 31,5 ml de NaOH 0,1 n.

Appareillage :

Polarimètre avec lampe à vapeur de sodium.

- 7.1. Peser exactement 25,00 g de l'échantillon finement rapé dans un bécher de 100 ml. Délayer dans 40 ml d'eau à 80°C. Transvaser la suspension dans un ballon jaugé de 250 ml avec environ 100 ml d'eau chaude. Refroidir jusqu'à environ 20°C et ajouter 3,75 ml d'acétate basique de plomb.

Si l'échantillon renferme plus de 20 % de cacao dégraissé, il faut ajouter 5 ml d'acétate basique de plomb.

Refroidir le ballon jaugé jusqu'à 20°C, compléter avec de l'eau à 20°C jusqu'à la marque et mélanger le contenu en agitant énergiquement. Filtrer la suspension homogène sur un filtre plissé. Jeter les premiers 20 ml du filtrat.

- 7.2. Pipeter 50 ml de la solution limpide, obtenue selon 7.1., dans un vase conique sec à bouchon rôdé. Ajouter 0,2 ml d'acide acétique glacial et bien mélanger. Mesurer la rotation de cette solution à 20°C. Effectuer au moins 6 lectures. Prendre la moyenne de ces lectures ($= d$). La rotation spécifique D de la solution est :

$$D = \frac{10,04 \times d}{L}$$

L = longueur en dm du tube de polarisation.

676

Si le saccharose est la seule substance optiquement active présente, sa teneur en pourcent de poids est :

$$S = \frac{15,06 \times d \times V}{L}$$

V = la correction de volume selon 7.4.

- 7.3. Pipeter 40 ml de la solution, obtenue selon 7.1., dans un ballon jaugé de 50 ml et ajouter 5 ml d'acide chlorhydrique 6,3 n. Introduire un thermomètre dans le ballon jaugé et porter le contenu du ballon à 60°C en 2 minutes dans un bain-marie. Maintenir le contenu du ballon à cette température pendant 10 minutes. Ensuite, refroidir rapidement le ballon jusqu'à 20°C. Sortir le thermomètre du ballon jaugé, le rincer à l'eau et compléter le volume avec de l'eau jusqu'au trait. Mélanger en agitant énergiquement.

Après une heure environ, déterminer la rotation de cette solution, dans le tube de polarisation utilisé sous 7.2. Effectuer au moins 6 lectures. Prendre la moyenne de ces lectures (= d').

La rotation spécifique J de la solution est :

$$J = \frac{12,5 \times d'}{L}$$

L = longueur en dm du tube de polarisation.

- 7.4. Le pourcentage non corrigé de saccharose est :

$$s = \frac{D - J}{0,8811}$$

Il faut faire intervenir un facteur de correction V pour le volume du précipité :

$$V = \frac{1000 - (1,02a + 0,8b)}{1000}$$

où a = pourcentage de matière grasse de l'échantillon, déterminé selon 3 ;

b = somme des pourcentages de cacao dégraissé et de protéines de lait de l'échantillon. Si la teneur en sucre (saccharose + lactose) est d'environ 40 %, b est calculé en déduisant de 102 la somme des pourcentages d'humidité, de matière grasse, de saccharose non corrigé et éventuellement de lactose non corrigé. Si le pourcentage de saccharose et de lactose est d'environ 50 % ou davantage, b est calculé comme précédemment en remplaçant 102 par 102,5. Dans la plupart des cas, V sera d'environ 0,95.

Le pourcentage de saccharose de la denrée est :

$$S = s \times V$$

677

8. Dosage du lactose en l'absence d'autres substances réductrices

Réactifs :

Solution d'oxalate de potassium : dissoudre 10 g de $K_2C_2O_4 \cdot H_2O$ dans 100 ml d'eau.

Solution de phosphate disodique: dissoudre 10 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ dans 100 ml d'eau.

Terre d'infusoires : mélanger 50 g de Celite 545 et 50 g de Celite Filter Cel, puis calciner le mélange à 800°C.

Iodure de potassium

Acide sulfurique 25 % en poids

Thiosulfate de sodium 0,1 n

Empois d'amidon 1 %

Réactif de Luff-Schoorl : préparer les trois solutions suivantes :

- a. 25 g de sulfate de cuivre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) dans 100 ml d'eau ;
- b. 388 g de carbonate de sodium ($Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$) dans 300 à 400 ml d'eau ;
- c. 50 g d'acide citrique ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) dans 50 ml d'eau.

Verser prudemment la solution c dans la solution b refroidie et brasser jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement d'acide carbonique. Ajouter à ce mélange, tout en remuant, la solution a. Laisser refroidir, compléter à un litre et filtrer après 24 heures. La solution ainsi préparée accuse un pH d'environ 9,9.

Contrôler le réactif comme suit :

- aa. A 25 ml du réactif ajouter 3 g d'iodure de potassium, dissous dans un peu d'eau, et 25 ml d'acide sulfurique 25 % en poids. Titrer avec du thiosulfate de sodium 0,1 n. A la fin de la titration, ajouter un peu d'empois d'amidon. La quantité de thiosulfate de sodium 0,1 n utilisée doit être de 25 ml.
- bb. Dans un ballon jaugé de 100 ml, introduire 10 ml du réactif et porter au trait.
Dans un vase conique, mélanger 10 ml de ce réactif dilué et 25 ml d'acide chlorhydrique 0,1 n chauffer une heure au bain-marie bouillant. Laisser refroidir, ramener au volume initial avec de l'eau et titrer avec NaOH 0,1 n en présence de phénolphthaléine. La quantité de NaOH 0,1 n utilisée doit être de 5,5 à 6,5 ml.
- cc. Titrer par HCL 0,1 n en présence de phénolphthaléine, 10 ml de réactif dilué suivant bb. La quantité de HCL 0,1 n utilisée doit être de 6 à 7,5 ml.

- 8.1. Pipeter 50 ml de la solution, obtenue selon 7.1, dans un ballon jaugé de 200 ml. Ajouter 2 ml d'oxalate de potassium tout en

678

remuant, attendre une minute, puis ajouter 2 ml de phosphate disodique, compléter avec de l'eau jusqu'à la marque et mélanger.

- 8.2. Transvaser le contenu du ballon dans un bécher sec, ajouter un peu de terre d'infusoires, agiter et filtrer sur un filtre plissé. Remettre les premiers ml du filtrat dans le filtre.
- 8.3. Pipeter 25 ml de réactif de Luff-Schoorl et 25 ml de la solution obtenue selon 8.2., dans un vase conique de 300 ml. Ajouter quelques fragments de pierre ponce et munir le vase conique d'un réfrigérant à reflux. Placer le récipient sur un treillis métallique recouvert d'un carton d'amiante percé d'un trou de même diamètre que le fond du vase conique. Porter le contenu du vase conique à l'ébullition en 2 minutes et maintenir pendant exactement 10 minutes une ébullition modérée.
- Si toute la solution cuivrique est réduite, diminuer la quantité de solution obtenue selon 8.2. et, après adjonction de 25 ml de réactif de Luff-Schoorl, ajouter de l'eau de façon que le volume atteigne 50 ml. (Le dosage donne les meilleurs résultats lorsque les 25 ml de solution contiennent entre 15 et 60 mg de sucre réducteur).

- 8.4. Refroidir rapidement jusqu'à 20°C. Ajouter 3 g d'iode de potassium dissous dans un peu d'eau, puis ajouter prudemment tout en agitant continuellement, 25 ml d'acide sulfurique. Titrer immédiatement la solution par le thiosulfate de sodium 0,1 n en agitant continuellement. Vers la fin de la titration, ajouter 1 à 2 ml d'empois d'amidon.
- 8.5. Exécuter de la même manière un essai à blanc, en remplaçant la solution sucrée par 25 ml d'eau.
- 8.6. Calculer de la manière suivante la teneur en lactose anhydre. Retrancher le nombre de ml de thiosulfate de sodium 0,1 n utilisé pour le dosage, du nombre de ml de thiosulfate de sodium utilisés pour l'essai à blanc. Chercher, à l'aide de la table selon Luff-Schoorl la quantité de lactose anhydre correspondant à la différence, soit m mg.

n = ml de solution sucrée utilisée en 8.3.

L' = % lactose anhydre non corrigé

$r = 0,25$ = facteur de correction pour réduction par le saccharose et les substances réductrices du cacao

V = facteur de correction pour le volume du précipité (voir 7.4.)

On peut retenir 0,95 à cet effet.

L = % lactose anhydre

$$L' = \frac{m.4}{n}$$

$L = (L' - r) V$ ou

$L = (L' - 0,25) 0,95$

679

8.7. Table selon Luff-Schoorl

0,1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Lactose anhydre	Différence	Glucose, fructose ou sucre interverti	Différence
ml	mg		mg	
1	3,6	3,7	2,4	2,4
2	7,3	3,7	4,8	2,4
3	11,0	3,7	7,2	2,5
4	14,7	3,7	9,7	2,5
5	18,4	3,7	12,2	2,5
6	22,1	3,7	14,7	2,5
7	25,8	3,7	17,2	2,6
8	29,5	3,7	19,8	2,6
9	33,2	3,8	22,4	2,6
10	37,0	3,8	25,0	2,6
11	40,8	3,8	27,6	2,7
12	44,6	3,8	30,3	2,7
13	48,4	3,8	33,0	2,7
14	52,2	3,8	35,7	2,8
15	56,0	3,9	38,5	2,8
16	59,9	3,9	41,3	2,9
17	63,8	3,9	44,2	2,9
18	67,7	4,0	47,1	2,9
19	71,7	4,0	50,0	3,0
20	75,7	4,1	53,0	3,0
21	79,8	4,1	56,0	3,1
22	83,9	4,1	59,1	3,1
23	88,0		62,2	

9. Dosage du glucose en présence de saccharose et en l'absence d'autres substances réductrices
- 9.1. Déterminer le pouvoir réducteur selon 8. et le calculer en glucose.
- 9.2. Déterminer la teneur en saccharose, selon 7.
10. Dosage du sucre interverti, en présence de saccharose et en l'absence d'autres substances réductrices
- 10.1. Déterminer le pouvoir réducteur selon 8. et le calculer en sucre interverti
- 10.2. Déterminer la teneur en saccharose selon 7.
11. Dosage du glucose et du sucre interverti en présence de saccharose et en l'absence d'autres substances réductrices

Réactifs :

Réactifs cités sous 8.

En outre :

Solution d'hydroxyde de sodium 8 n.

Solution d'hydroxyde de sodium 4 n.

680

Solution concentrée d'iode :

dissoudre 130 g d'iode et 150 g d'iodure de potassium dans de l'eau et diluer jusqu'à un litre.

Solution d'iode 0,1 n.

Acide sulfurique 4 n.

Solution saturée de sulfite de sodium : préparer une solution saturée de $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau.

Solution de sulfite de sodium 2 % : dissoudre 2 g de $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 100 ml d'eau. La solution doit toujours être préparée extemporanément.

Solution de rouge de méthyle : 0,2 % dans l'éthanol à 70 vol. %.

11.1. Déterminer la teneur en saccharose selon 7.

11.2. Déterminer comme suite la teneur en sucre interverti :

11.2.1. Pipeter a ml de la solution obtenue sous 8.2. (au maximum 50 ml, correspondant au minimum à 120 mg et au maximum à 480 mg de sucre interverti) dans un ballon jaugé de 100 ml, diluer avec de l'eau jusqu'à 50 ml, ajouter 2,5 ml de la solution d'hydroxyde de sodium 8 n et 16 ml de la solution concentrée d'iode ou davantage jusqu'à obtention d'une coloration brune persistante. Après 5 à 7 minutes, ajouter 3 ml d'acide sulfurique 4 n. Eliminer l'excès d'iode d'abord à l'aide de la solution saturée du sulfite de sodium jusqu'à affaiblissement de la coloration brune. Ajouter un peu d'empois d'amidon. La solution doit être colorée en bleu, sinon ajouter de la solution d'iode 0,1 n jusqu'à coloration bleue. Décolorer ensuite soigneusement la solution par le sulfite de sodium 2 %. Neutraliser par la solution d'hydroxyde de sodium 4 n en présence de rouge de méthyle et compléter jusqu'à la marque.

11.2.2. Pipeter 25 ml de la solution obtenue sous 11.2.1. dans un matras conique de 300 ml et déterminer la teneur en fructose selon Luff-Schoorl suivant le processus décrit en 8.3., 8.4. et 8.5.

11.2.3. Calculer comme suit la teneur en sucre interverti :

La teneur non corrigée en fructose est :

$$F' = \frac{16 f}{a}$$

f = mg de fructose d'après la table de Luff-Schoorl (8.7)

a = nombre de ml de la solution de sucre employés sous 11.2.1.

La teneur corrigée en fructose est alors :

$$F = (F' - r) V$$

ou

$$F = (F' - 0,25) 0,95$$

r et V représentant les facteurs de correction selon 8.6.

681

La teneur en sucre interverti I de la denrée est

$$I = 2 F$$

N.B.

Si a ml de la solution obtenue sous 8.2. sont insuffisants pour le dosage, il faut, pour l'opération décrite sous 8.2., partir d'une plus grande quantité de la solution obtenue sous 7.1.

- 11.3. Déterminer le pouvoir réducteur total selon 8. et l'exprimer en glucose (R_1).

La teneur en glucose G de la denrée est :

$$G = R_1 - I.$$

12. Indice butyrique semi-micro

Réactifs

Solution aqueuse concentrée de KOH : 750 g KOH par litre de solution.

Solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 0,5 n :

40 ml de solution aqueuse concentrée de KOH, ajouter 40 ml d'eau et compléter à un litre par de l'éthanol à 96 % vol. Le tirage de 5 ml de cette solution nécessite de 25 à 27 ml de HCl 0.1. n.

Glycérine p.s. 1.23. (88 % en poids)

Acide sulfurique, 25 % en volume

Solution de sulfate de potassium : solution aqueuse saturée à 20° C (10 % en poids).

Solution de savon de cocose :

Dans un ballon de 500 ml saponifier sur une flamme libre, 50 g de graisse de coco pure par 15 g d'hydroxyde de potassium en présence de 50 g de glycérine et de 20 ml d'eau. Laisser refroidir en-dessous de 100° C et diluer à l'eau jusqu'à 500 ml.

Terre d'infusoires

Solution éthanolique de phénolphtaléine à 1 %.

682

Apparatuur (zie tekeningen)

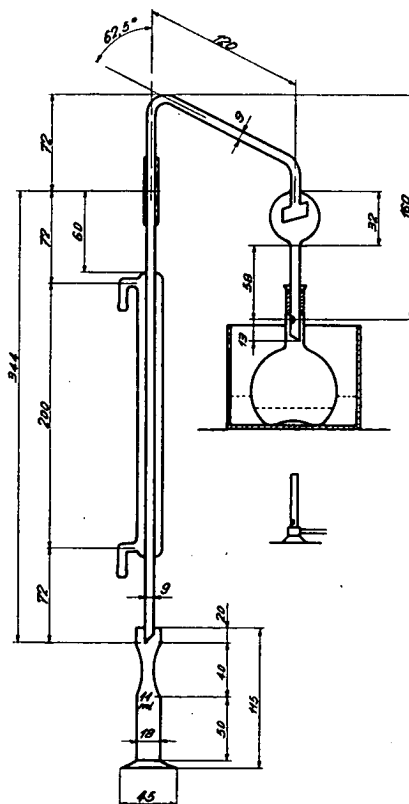


Fig. 1

682

Appareillage (voir figures)

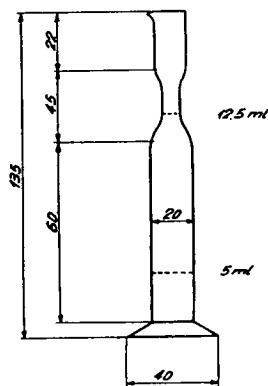


Fig. 2

- 12.1. Dans un ballon à fond plat de 50 ml, déposer successivement 500-520 mg de la graisse obtenue selon 3, quelques fragments de pierre ponce et 5 ml de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 0,5 n. Surmonter le ballon d'un réfrigérant à eau, faire bouillir le liquide au bain-marie jusqu'à disparition de la graisse, puis prolonger l'ébullition pendant 5 min.
- 12.2. Ajouter ensuite 1 ml de glycérine et faire bouillir sans réfrigérant jusqu'à ce que la plus grande partie de l'éthanol soit évaporée, c'est-à-dire jusqu'à ce que le liquide commence à mousser fortement. Placer le ballon incliné durant 1 h dans une étuve à 100-105° C.
- 12.3. Aussitôt après avoir sorti le ballon de l'étuve, ajouter 15 ml de solution de sulfate de potassium, fermer le ballon avec un bouchon de liège et agiter fortement jusqu'à ce que le savon soit homogène.
Au besoin, remettre à l'étuve, pendant quelques instants, le ballon fermé. Laisser refroidir le liquide jusqu'à 20° C et placer le ballon pendant 10 min. dans un bain-marie à 20° C. Ajouter ensuite, en remuant constamment, 0,5 ml d'acide sulfurique à 25 %, 1 ml de solution de savon de cocose et 0,1 g de terre d'infusoires. Mélanger et laisser le ballon dans le bain-marie à 20° C pendant 5 min. environ. Secouer fortement, filtrer sur un filtre plissé sec de 10 cm de diamètre et recueillir le filtrat dans un tube de Beckel (voir dessin), jusqu'à obtention de 12,5 ml de filtrat. Si la quantité de filtrat est trop faible, presser le contenu du filtre avec une éprouvette.
- 12.4. Transvaser le filtrat dans un ballon à fond plat de 50 ml, rincer avec 5 ml d'eau, ajouter quelques fragments de pierre ponce. Effectuer la distillation au bain d'huile à 175° C, en utilisant l'appareil représenté par le dessin. (Le niveau d'huile dépassera de 1 cm celui du contenu du ballon). Recueillir 11 ml de distillat dans un tube de Beckel approprié. Transvaser le distillat dans un vase conique de 50 ml, ajouter une goutte de phénolphtaléine à 1 % et titrer avec de la solution d'hydroxyde de sodium 0,01 n jusqu'à coloration rouge permanente. A l'aide du liquide titré, rincer le tube de Beckel et titrer à nouveau jusqu'à coloration rouge permanente (chiffre de titrage total = a). Effectuer un essai à blanc sur 500 mg d'une graisse de cacao de référence (chiffre de titrage = b).
- 12.5. L'indice butyrique semi-micro (SMB) est :

$$\text{SMB} = \frac{100 (a - b) \times 1,4 \times t \times 500}{G}$$

t = titre de la solution d'hydroxyde de sodium utilisée
G = poids en mg de la prise d'essai

- 12.6. Le pourcentage de graisse de lait dans la denrée est :

$$\frac{\text{SMB}}{20} \times \text{le pourcentage de graisse totale dans la denrée.}$$

13. **Appréciation de la pureté du beurre de cacao par son point d'aniline**

Définition: le point d'aniline est la température de démixtion d'une solution de graisse dans l'aniline, déterminée selon le mode opératoire décrit ci-dessous.

Réactifs

Aniline, fraîchement distillée.

Introduire 25 ml d'aniline, une pointe de spatule de poudre de zinc et un peu de pierre ponce dans un ballon à distiller de 100 ml. Relier le ballon à un réfrigérant à air (diamètre environ 1 cm., longueur environ 50 cm). Ecarter le premier distillat et recueillir ensuite l'aniline pure.

Sulfate de magnésium anhydre.

Ether de pétrole : point d'ébullition 40-60° C.

- 13.1. Introduire 70 g de la denrée finement moulue dans un flacon, ajouter environ 150 ml d'éther de pétrole, bien fermer et agiter pendant 15 min. à l'agitateur mécanique. Filtrer la solution. Evaporer l'éther de pétrole. Sécher la graisse obtenue en filtrant sur sulfate de magnésium dans une étuve à environ 60° C.
- 13.2. Peser exactement dans un tube à essai taré environ 1 g de la graisse, soit p grammes. Ajouter 4 p grammes d'aniline et fermer le tube à l'aide d'un bouchon traversé par un thermomètre et par un agitateur d'aluminium. Placer le tube dans un bécher contenant de l'eau chaude. Lorsque le mélange est devenu limpide, retirer le tube du bain et le placer dans un manchon à air entouré lui-même d'un bain dont la température est de 3° inférieure au point de démixtion à prévoir. Laisser refroidir lentement le mélange, tout en le remuant. Surveiller le moment où le mélange se trouble et noter la température.
- 13.3. Corriger la température, obtenue selon 13.2., à l'aide d'une valeur qui est fonction du degré d'acidité de la graisse.
- Le point d'aniline AP, exprimé en °C est :
- $$AP = t + 0,18 Z$$
- t = la température de démixtion notée
- Z = le degré d'acidité obtenu selon 14
- Le point d'aniline du beurre de cacao pur est 42° C - 44° C.

685

14. Degré d'acidité

Définition : le degré d'acidité est le nombre de ml d'alcali caustique 1 n, nécessaire pour neutraliser les acides libres de 100 g de graisse.

Réactifs :

Benzène

Ethanol 96 % vol

Ether

Solution d'hydroxyde de sodium, 0,1 n

Phénolphthaléine, solution éthanolique à 1 %.

- 14.1. Peser, dans un matras conique, 8 à 10 g de graisse obtenue en 13.1. Dissoudre la graisse dans 50 ml d'un mélange, à partie égales, d'éthanol et d'éther ou de benzène, neutralisé au préalable par de la solution d'hydroxyde de sodium 0,1 n en présence de phénolphthaléine.
Titrer la solution obtenue, en l'agitant constamment, par la solution d'hydroxyde de sodium 0,1 n en présence de phénolphthaléine.

- 14.2. Calculer comme suit le degré d'acidité :

$$Z = \frac{10 \times v}{p}$$

v = ml de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 n

p = poids de la graisse, en grammes

Calculer la valeur à une décimale près.

15. Indice de réfraction

- 15.1. Déterminer l'indice de réfraction $n \frac{D}{40}$ de la graisse obtenue sous 13.1., jusqu'à la 4^e décimale.

16. Filth-test*Réactifs :*

Acide chlorhydrique, 4 n

Ethanol, 96 % vol

Ether de pétrole, P.E. 40 - 60° C

Paraffine liquide

Appareillage :

Ampoule à décantation, terminée par un corps cylindrique (diamètre 1 cm, longueur 8 cm) au-dessus du robinet

Deux plaques de verre, dont une dotée d'un quadrillage à écartement de 2 mm. Les traits doivent être numérotés

Filtre au kieselguhr, Delta n° 325, ou équivalent, diamètre 4 cm

Filtre, SS n° 1575 ou équivalent, diamètre 5 cm

Bande adhésive transparente

- 16.1. Déposer 50 g de l'échantillon préparé selon 1. dans un vase conique de 1 litre. Ajouter 350 ml d'eau et 50 ml d'acide chlorhydrique. Porter le mélange à l'ébullition, tout en la remuant, et maintenir l'ébullition pendant 1 heure. Veiller à ce qu'aucun composant solide n'adhère à la paroi du vase, au-dessus du liquide. Laisser refroidir quelque peu.
- 16.2. Ajouter 20 ml de paraffine, remuer énergiquement et ajouter de l'eau jusqu'à ce que la couche de paraffine se trouve dans le col du vase. Laisser reposer le vase pendant 15 min.
- 16.3. Remplir d'eau le corps cylindrique de l'ampoule de décantation, transvaser la paraffine et une partie du liquide aqueux dans l'ampoule à décantation. Compléter le volume du vase avec de l'eau et transvaser à nouveau dans l'ampoule à décantation. Répéter cette opération jusqu'à ce que toute la paraffine soit passée dans l'ampoule à décantation. Laisser reposer pendant 15 minutes.
- 16.4. Introduire à nouveau 5 ml de paraffine dans le vase et agiter convenablement tout le contenu. Ajouter de l'eau jusqu'à ce que la couche de paraffine se trouve dans le col du vase. Laisser reposer pendant 15 min.
- 16.5. Laisser s'écouler l'eau de l'ampoule à décantation tout en veillant à ce que la partie cylindrique reste remplie d'eau. Transvaser ensuite, dans l'ampoule à décantation, la couche de paraffine du vase et une partie de la solution aqueuse.
- 16.6. Répéter deux fois les opérations 16.4. et 16.5.
- 16.7. Laisser à nouveau s'écouler la majeure partie de l'eau de l'ampoule à décantation, ajouter 300 ml d'eau. Agiter, puis, après avoir laissé reposer pendant 15 minutes, évacuer la plus grande partie de l'eau. Répéter cette opération jusqu'à ce que l'eau évacuée soit limpide.
- 16.8. Ajouter 100 ml d'éther de pétrole et 200 ml d'eau. Agiter et après avoir laissé reposer pendant 15 minutes, évacuer l'eau jusqu'à ce qu'il n'en reste plus que quelques ml.
- 16.9. Sur un filtre Buchner de 4 cm de diamètre, placer un filtre au kieselguhr surmonté du filtre SS n° 1575. Faire adhérer ce dernier au pourtour de la paroi du Buchner.
- 16.10. Verser, par fractions le liquide de l'ampoule à décantation sur le filtre et aspirer, en couvrant le Buchner d'un verre de montre. Rincer complètement l'ampoule à décantation à l'eau et verser l'eau de rinçage sur le filtre. Rincer à quatre reprises avec 20 ml d'éthanol.
- 16.11. Déposer le filtre dans une boîte de Petri et le sécher à 60° C. Imprégner le filtre par quelques gouttes de paraffine réparties sur la surface.

687

- 16.12. Placer le filtre entre les deux plaques de verre, de telle sorte que les traits de la plaque quadrillée soient directement en contact avec le filtre. Fixer les deux plaques de verre à l'aide de bandes adhésives transparentes.
- 16.13. Compter sous faible grossissement les insectes, les acariens, leurs fragments ainsi que les poils de rongeurs, présents sur toute la surface du filtre.
- 16.14. Exprimer le résultat pour 100 g de matière.
17. **Phosphatides** ⁽¹⁾
18. **Examen microbiologique** ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Ces deux méthodes feront l'objet d'un complément à la présente Recommandation.